

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-136968

(43)Date of publication of application : 22.05.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
B32B 9/02
C12M 1/34
C12Q 1/68
G01N 33/543

(21)Application number : 11-320913

(71)Applicant : MITSUBISHI RAYON CO LTD

(22)Date of filing : 11.11.1999

(72)Inventor : ITO CHIHO
SUMI TOSHINORI
AKITA TAKASHI

(54) BIOPOLYMER-IMMOBILIZED FILM LAMINATE AND THIN FILM THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCING THEM

(57)Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a thin film on which biopolymers are immobilized.

SOLUTION: A laminate of a biopolymer-immobilized film on which two biopolymers or more were immobilized in lines or strips, and a thin film having a biopolymer-immobilized film cross-section obtained by cutting the laminate to the direction crossing the oriented direction in lines or strips of the biopolymer are obtained, and a method for producing them is provided. This method allows reproducibly and efficiently obtaining a thin film on which biopolymers are arbitrarily, densely, accurately, two-dimensionally oriented. This thin film allows assaying the kind and amount of biopolymers in a specimen.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-136968

(P2001-136968A)

(43) 公開日 平成13年5月22日 (2001. 5. 22)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	B 3 2 B 9/02	4 B 0 2 4
B 3 2 B 9/02		C 1 2 M 1/34	Z 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/543	5 9 1 4 F 1 0 0
G 0 1 N 33/543	5 9 1	C 1 2 N 15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-320913

(22) 出願日 平成11年11月11日 (1999. 11. 11)

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社
東京都港区港南一丁目6番41号

(72) 発明者 伊藤 千穂

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内

(72) 発明者 隅 敏則

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内

(72) 発明者 秋田 陸

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体高分子固定化フィルム積層体及びその薄片並びにそれらの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 生体高分子が固定化された薄片の提供。

【解決手段】 少なくとも2種類の生体高分子が線状又は
帯状に固定化された生体高分子固定化フィルムの積層
体、該積層体を生体高分子の線状又は帯状の配列方向と
交差する方向に切断して得られる生体高分子固定化フィ
ルム断面を有する薄片、及びそれらの製造方法。

【効果】 本発明によれば、生体高分子が任意に高密度
且つ正確に二次元に配列された薄片を再現性よく効率的
に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の生体
高分子の種類および量を調べることができる。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも2種類の生体高分子が線状又は帯状に平行に配列、固定化された生体高分子固定化フィルムの積層体であって、該配列方向が同一である生体高分子固定化フィルム積層体。

【請求項2】 生体高分子固定化フィルムが、フィルム面方向1 cm当たり10列以上の生体高分子の配列を含むものである請求項1記載の生体高分子固定化フィルム積層体。

【請求項3】 生体高分子固定化フィルム積層体が、積層方向1 cm当たり10層以上の生体高分子固定化フィルムを含むものである請求項1記載の生体高分子固定化フィルム積層体。

【請求項4】 固定化された生体高分子の種類が、生体高分子固定化フィルム積層体を構成する各生体高分子固定化フィルムの固定化領域の全部又は一部において異なるものである請求項1～3のいずれか1項に記載の生体高分子固定化フィルム積層体。

【請求項5】 固定化された生体高分子が核酸である請求項4記載の生体高分子固定化フィルム積層体。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載の生体高分子固定化フィルム積層体を生体高分子の線状又は帯状の配列方向と交差する方向に切断して得られる生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片。

【請求項7】 薄片1 cm²当たり100以上の生体高分子固定化領域を含む請求項6記載の生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片。

【請求項8】 生体高分子の種類が、薄片中の生体高分子固定化領域の全部又は一部において異なるものである請求項6又は7に記載の生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片。

【請求項9】 生体高分子をフィルム面へ線状又は帯状に平行に印刷、固定化した後、これを線状又は帯状の配列方向が同一となるようにフィルムの厚さ方向に逐次積層することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の生体高分子固定化フィルム積層体の製造方法。

【請求項10】 生体高分子をフィルム面へ線状または帯状に平行に印刷、固定化した後、これを線状または帯状の配列方向が巻取軸と平行となるように巻取りフィルムの厚み方向に連続的に積層することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の生体高分子固定化フィルム積層体の製造方法。

【請求項11】 請求項9又は10の方法で得られた生体高分子固定化フィルム積層体を生体高分子の線状又は帯状の配列方向と交差する方向に切断することを特徴とする請求項8記載の生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、臨床検査、食品検

2

査等の分野などに利用できる核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子が固定化された高分子材料並びに製造方法に関する。詳しくは、生体高分子固定化フィルム積層体及びその薄片並びにそれらの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一個体レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

【0003】 最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用方法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

【0004】 核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロンシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0005】 しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化

3

学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポットティング固定化する方法 [Science 270, 467-470 (1995)] は、スポット密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法 (U. S. Patent 5, 445, 934, U. S. Patent 5, 774, 305) と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィ技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積当たり合成する核酸種数 (スポット密度) 及びスポット当たりの固定化量 (合成量)、並びに再現性等において、スポットティング法より優れるとされるものの、固定化する化合物種は、フォトリソグラフィにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、また cDNA 等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

【0006】また、生体高分子の配列体を製作する方法として、線状の支持体に生体高分子を固定しそれを一列に配列後、巻き取り、隙間に充填剤を入れてロッドにした後、そのロッドを薄くスライスすることで生体高分子の配列体を得る方法 (特開平11-108928号公報参照) が開示されているものの、線状の支持体に生体高分子を固定化した後シート状に配列することから、工業的に高密度に再現性よく配列することは困難である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】このような状況下、分子の大きさによらず核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子を所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的な方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

【0008】具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポットティングや微量分注による生体高分子配列体製造法に比べ、生体高分子固定化量が高く、単位面積あたり配列される生体高分子の分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち生体高分子が固定化された二次元的 (平面的) 配列体 (固定化生体高分子二次元配列体) の製造法の確立である。また、本発明が解決しようとする課題は例えば生体高分子

(3)

4

として核酸を例にとった場合、シリコン基盤上へのフォトリソグラフィと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cDNAを含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化生体高分子二次元配列体製造法の確立である。

【0009】また、本発明が解決しようとする課題は線状の支持体への生体高分子の固定と、それらを配列後、ロッドにした後、スライスすることで生体高分子の配列体を得る製造方法にくらべ、製造コストのより低く、高密度に再現性よく生体高分子の配列体を得る製造法の確立である。そこで、本発明は、核酸、蛋白質、多糖類などの生体高分子が固定化された生体高分子固定化フィルム積層体及びその薄片並びに製造方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、生体高分子配列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上でのみで行う従来法の発想を改め、各種生体高分子の1次元配列固定化プロセスをパターンニング技術を用いてフィルムにそれぞれ独立して行い、さらにそれらの1次元配列固定化プロセスに各種のフィルム賦形、積層技術を導入することにより生体高分子固定化フィルム積層体を作製し、得られる積層体の薄片化プロセスを経ることで、固定化生体高分子二次元配列体を作製し得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、少なくとも2種類の生体高分子が線状又は帯状に平行に配列、固定化された生体高分子固定化フィルムの積層体であって、該配列方向が同一である生体高分子固定化フィルム積層体である。該積層体としては、例えば、生体高分子固定化フィルムが、フィルム面方向1cm当たり10列以上の生体高分子の配列を含むもの、積層方向1cm当たり10層以上の生体高分子固定化フィルムを含むもの、固定化された生体高分子の種類が、生体高分子固定化フィルム積層体を構成する各生体高分子固定化フィルムの固定化領域の全部又は一部において異なるもの、また、固定化された生体高分子が核酸であるものなどが挙げられる。

【0012】さらに、本発明は、前記各生体高分子固定化フィルム積層体を生体高分子の線状又は帯状の配列方向と交差する方向に切断して得られる生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片である。該薄片としては、例えば、薄片1cm²当たり100以上の生体高分子固定化領域を含むもの、また、生体高分子の種類が、薄片中の生体高分子固定化領域の全部又は一部において異なるものなどが挙げられる。

【0013】さらに、本発明は、生体高分子をフィルム面へ線状又は帯状に平行に印刷、固定化した後、これを線状又は帯状の配列方向が同一となるようにフィルムの厚さ方向に逐次積層する、あるいは、生体高分子をフィ

5

ルム面へ線状または帯状に平行に印刷、固定化した後、これを線状または帯状の配列方向が巻取軸と平行となるように巻取りフィルムの厚み方向に連続的に積層することを特徴とする前記各生体高分子固定化フィルム積層体の製造方法である。

【0014】さらに、本発明は、前記各方法で得られた生体高分子固定化フィルム積層体を生体高分子の線状又は帯状の配列方向と交差する方向に切断することの特徴とする前記各生体高分子固定化フィルム断面を有する薄片の製造方法である。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、少なくとも2種類の生体高分子が線状または帯状の固定化領域に固定化された生体高分子固定化フィルムを重ねて層状にした積層体並びにその製造方法に関し、また、該積層体をフィルムの厚さ方向に切断することにより得られる薄片並びにその製造方法に関する。本発明の積層体及び薄片、並びにその作製の概要を以下に説明する。

【0016】本発明において、フィルムに固定化する対象となる生体高分子としては、デオキシリボ核酸 (DNA) やリボ核酸 (RNA)、ペプチド核酸 (PNA)、オキシペプチド核酸 (OPNA) などの核酸、あるいは、蛋白質、多糖類などが挙げられる。本発明に用いる生体高分子は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。

【0017】例えば、生体高分子として核酸を用いる場合には、生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法 (Blin et al., Nucleic Acids Res. 3:2303 (1976)) 等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法 (Favaloro et al., Methods Enzymol. 65:718 (1980))

等により行うことができる。更には、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0018】本発明では、生体高分子をそのまま固定化してもよく、また、生体高分子に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた生体高分子を固定化してもよい。例えば、生体高分子として核酸を用いる場合、核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシングニン化等が知られており [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコル (1) DIGハイブリダイゼーション (秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用するこ

(4)

とができる。

【0019】本発明において、上述のごとく調製した生体高分子は、そのまま溶液状にして先に述べた各種印刷技術を用いてフィルム上に塗布して直接固定化してもよいし、必要に応じてバインダー樹脂溶液と混合して固定化しても良い。生体高分子をフィルムに直接固定化する場合、例えばフィルムと生体高分子との間における各種化学的又は物理的な相互作用、すなわちフィルムが有している官能基と、生体高分子のヌクレオチドを構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。

【0020】例えば、生体高分子として核酸を用いる場合、無修飾の核酸のをフィルムに固定化する場合、生体高分子とフィルムとを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。また、アミノ基で修飾された核酸のをフィルムに固定化する場合、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 等の架橋剤を用いてフィルムの官能基と結合させることができる。生体高分子を含む試料をフィルムに作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～60℃が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

【0021】生体高分子をバインダー樹脂溶液と混合して固定化する場合、本発明に用いることのできるバインダー樹脂としては特に制限されるものではないが、例えばアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ) アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の一種類または二種類以上の共重合体が挙げられ、必要に応じてメチレンビス (メタ) アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ (メタ) アクリレート等との多官能性単量体と共重合して架橋することができるし、塗布後に架橋させることもできる。その他本発明に用いることができるバインダー樹脂として、例えば、アガロース、アルギン酸、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、またはこれらを架橋したものを用いることができる。

【0022】生体高分子は、バインダー樹脂に物理的に包括固定化されていてもよいし、バインダー樹脂構成成分への直接的な結合を利用してもよく、生体高分子を一旦高分子体や無機粒子などの担体に共有結合又は非共有結合により結合させ、その担体をバインダー樹脂に物理的に包括固定化してもよい。例えば、生体高分子の末端基にビニル基を導入し (WO98/39351号公報参照)、ポリアクリルアミドの構成成分と共重合させることができる。共重合においては、単量体、多官能性単量

7

体及び重合開始剤と共に共重合する方法、単量体及び重合開始剤と共に共重合したのち、架橋剤でゲル化する方法などがある。

【0023】また、アガロースを臭化シアン法でイミドカルボネート化しておき、末端アミノ化した生体高分子のアミノ基と結合させることもできる。この際、生体高分子固定化したアガロースと他のバインダーポリマーと混合してもよい。

【0024】その他の方法としては、高分子粒子や無機粒子等の担体に生体高分子を結合し、該粒子を上述のバインダーポリマーに包括固定化する方法が挙げられる。例えば、ビオチン化した生体高分子とアビジン化したアガロースビーズ（シグマ社製アビジン化アガロース等）を反応させることによって、生体高分子が固定化されたアガロースビーズを得ることができる。生体高分子固定化アガロースビーズはポリアクリルアミド等に包括固定化することができる。また、バインダーポリマーや担体への結合においては、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて結合させることもできる。

【0025】本発明において、フィルムに少なくとも2種類の生体高分子を線状または帯状の固定化領域に固定化する方法、例えば、好ましくは1cmあたり10以上の生体高分子固定化領域を線状または帯状の固定化領域に固定化する方法としては、線状または帯状の支持体に予め生体高分子を固定化した後フィルムに固定化することもできるが、フィルム上に印刷技術を用いて固定化することでパターンニングすることにより、製造コストがより低く、かつ高密度に再現性よく、生体高分子を線状または帯状の固定化領域に固定化することができる。

【0026】本発明に用いられる印刷技術としては、生体高分子を固定化できるものであれば特に限定されるものではないが例えば凸版印刷、平板印刷、グラビア印刷、スクリーン印刷、インクジェット印刷等の技術が挙げられる。さらには、各種放射光を利用したフォトリソグラフィ技術を利用することもできる。これらの印刷（リソグラフィ）は、フィルム上に直接行うこともできるし、離型性基材に印刷した後転写することもできる。また、線状または帯状の生体高分子固定化領域のほかに、各固定化領域を分離するためのスペーサー領域を同時にまたは順次印刷することができる。

【0027】本発明において、生体高分子の固定化に用いることができるフィルム材料としては、生体高分子を固定化できるものであれば特に限定されるものではないが、合成高分子、半合成高分子、天然高分子等を材料とするフィルムを用いることができる。合成高分子としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン及びその共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、飽和ポ

(5)

8

リエステル、ポリビニルアルコール、ポリアミド（例えばナイロン6、ナイロン66、ナイロン610、ナイロン11等）、ポリイミド、ポリフェニレンオキシド、ポリスルホン、ポリパラキシレン、ポリアミドイミド、ポリエステルイミド、ポリベンゾイミダゾール等が挙げられる。半合成樹脂の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キトサン等のセルロース系誘導体が挙げられる。天然高分子の代表例としては、セルロース、でんぷん、キチン、コラーゲン等が挙げられる。

【0028】本発明に用いるフィルムの厚みは、特に規定されるものではないが、好ましくは0.1μmから1000μmである。本発明に用いるフィルムは、特にその形態が規定されるものではない。例えば、平滑な表面を有するものでもよく、多孔質膜又は多孔質表面を有するものでもよく、不織布等でもよい。この場合、生体高分子の固定化領域としてフィルム表面、フィルム内部又はフィルム内部の空隙等を利用することも可能である。

【0029】本発明に用いるフィルムは、無処理の状態ですのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入したフィルムであってもよく、また、プラズマ処理やγ線、電子線などの放射線処理を施したフィルムであってもよく、予めプライマー層を形成しても良い。プライマー層を構成する高分子としては、特に制限されないが、例えばアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の一種類または二種類以上の共重合体が挙げられ、必要に応じてメチレンビス(メタ)アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート等の多官能性単量体と共重合して架橋することができる。その他本発明に用いることができる高分子として、例えば、アガロース、ポリアルギン酸、ポリアスパラギン酸、ポリリジン等のポリアミノ酸、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、またはこれらを架橋したものを用いることができる。

【0030】上述の方法により得られた生体高分子固定化フィルムは、適当な化学的又は物理的处理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定化された生体高分子を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた生体高分子を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する。そして、処理後のフィルムを生体高分子を検出する材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、生体高分子を含む試料をフィルムに固定化する前に適宜実施してもよい。

9

【0031】上記の通り調製された生体高分子固定化フィルムは、本発明の生体高分子固定化フィルム積層体を構成する基本単位とすることができる。

【0032】図1において、フィルム1～3の3種類を積層すべきフィルムとして使用する場合を例示する。フィルム1～3上の生体高分子固定化領域4～12にはそれぞれ異なる種類の生体高分子とすることが可能であり、また同一の生体高分子が複数固定化されていてもよい。上記フィルムは、x、y及びz軸の3次元座標において、xy平面を基準として、z軸方向に積層する(図1(a))。その結果、フィルム1～3を積層すると積層体(A1)を得ることができる(図1(b))。積層するフィルムの層数は特に限定されるものではないが、通常は、1枚のフィルムの厚さに応じて10～1,000層となるように積層することが好ましい。次に、各フィルム同士を接着後、フィルムの厚さ方向に積層体を切断(スライス)する。すなわち、積層体(A1)を、yz平面により、x軸に交差する方向に切断する。その結果、フィルム1～3の生体高分子固定化領域4～12のすべてを含む薄片(P1)を得ることができる(図1(c))。

【0033】また、図2においてフィルム13を積層すべきフィルムとして使用する場合を例示する。フィルム13上の生体高分子固定化領域14～22には、それぞれ異なる種類の生体高分子とすることが可能であり、また同一の生体高分子が複数固定化されていてもよい(図2(a))。フィルム13を生体高分子固定化領域14～22の全てがyz平面の端面に表出している(露出している)ように、X軸を巻き取り軸として巻き取ると積層体(A2)を得ることができる(図2(b))。積層するフィルムの枚数は特に限定されるものではなく、複数のフィルムを予め積層してから積層しても良いし、複数のフィルムを連続的に積層しても良い。積層するフィルムの層数は特に限定されるものではないが、通常は、1枚のフィルムの厚さに応じて10～1,000層となるように積層することが好ましい。次に、各フィルム同士を接着後、フィルムの厚さ方向に積層体を切断(スライス)する。すなわち、積層体(A2)を、yz平面により、x軸に交差する方向に切断する。その結果、フィルム13の生体高分子固定化領域14～22のすべてを含む薄片(P2)を得ることができる(図2(c))。

【0034】上記フィルムの接着方法としては、特に限定されるものではなく、一般的に知られる接着方法、例えば、ラミネート加工法により接着することができる。ラミネート加工法としては、ホットメルトラミネート、ドライラミネート、ウェットラミネート等が挙げられる。

【0035】ホットラミネートに用いられる接着剤としては低分子量ポリエチレン-酢ビ共重合体、パラフィンワックス、エチレン-アクリル酸エステル共重合体など

(6)

10

が使用され、これらを加熱溶解して塗布した後直ちに圧着し積層することができる。ドライラミネートに用いられる接着剤としては、酢酸ビニル、塩化ビニル、塩化ビニリデンなどのビニル系樹脂、ニトロセルロース、エチルセルロースなどのセルロース系樹脂、エポキシ系樹脂、ゴム系樹脂などが挙げられ、これらの溶液をフィルムにコーティングした後乾燥し、その後加圧または、加熱加圧して圧着し、積層することができる。

【0036】ウェットラミネートに用いられる接着剤としては例えばカゼイン、グルテン、ゼラチン、デキストリン、澱粉等の水溶性の接着剤や、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルブチラル、酢酸ビニル-アクリル酸エステルの共重合体等のエマルジョン、合成ゴムラテックス等が挙げられ、これらを塗布した後直ちに圧着し、乾燥して積層することができる。

【0037】また、接着、固定化された積層体の切断方法としては、例えば、マイクロームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みは任意に調整することができるが、通常0.1～1000 μ mである。

【0038】薄片中の各々の生体高分子固定化領域に固定化されている生体高分子の種類は、それぞれ異なる種類の生体高分子とすることが可能であるし、また、同一の生体高分子を任意の数を含むこともできる。即ち、本発明によれば、固定化された生体高分子の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。薄片の断面積あたりの生体高分子の数に関しては、用いる生体高分子固定化フィルムに固定化する生体高分子の数や、用いる生体高分子固定化フィルムの厚さ又は固定化方法等を適宜選択することにより、薄片断面積1 cm^2 あたり100以上、更には1000以上の生体高分子が固定化された薄片を作製することも可能である。

【0039】この場合、フィルムに固定化された生体高分子の種類があらかじめ決められた状態で積層することが望ましいが、必ずしもそのように積層させる必要はない。その理由は、積層体を形成する段階ではフィルムに固定化した生体高分子の種類が不明でも、積層体の断面を切断した後、一旦ハイブリダイゼーション手法等を用いて断面における生体高分子の種類と配置位置を決定することにより、特定の生体高分子が固定されたフィルムの位置を確認することができるためである。従って、この手法を用いて、一度、薄片内に配置された複数種類の生体高分子の種類と位置を決定しておけば、同一配列体から得られる薄片はすべて同一の位置配置であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の生体高分子の位置配置がわかる。

【0040】これら薄片は、例えば固定化された生体高分子が核酸である場合、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行う

11

ことにより、検体中の特定の塩基配列を有する生体高分子の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等の検体試料側生体高分子と特異的に結合することができる固定側生体高分子を指す。従って、これらの薄片の利用法としては、固定化された生体高分子（プローブ）とハイブリッドを形成する検体試料側生体高分子を検出するための利用に留まらず、固定化された生体高分子と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料を検出するための利用が挙げられる。

【0041】ハイブリッドの検出の場合には、ハイブリッドを特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の生体高分子に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作成させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0042】

【実施例】本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【0043】参考例1

オリゴヌクレオチド及び5'末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの調製：

以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）を合成した。

プローブA：GCGATCGAAACCTTGCTGACGAGCGAGGCTC（配列番号1）

プローブB：GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTGGGACAGCAG（配列番号2）

アクリルアミド

メチレンビスアクリルアミド

2, 2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）二塩酸塩

ビオチン化オリゴヌクレオチド（プローブA又はプローブB）

アビジン化アガロース（6%）懸濁液（シグマ社）

アガロース水溶液（0.2%）

ポリアクリルアミド

3.8重量部

0.3重量部

0.1重量部

0.005重量部

1.0重量部

94.3重量部

0.5重量部

2cm×10cmのポリエチレンテレフタレートフィルムを、ヤマト化学株式会社製プラズマエッチング装置（PLASMA REACTOR MODELPR-302）を用いて、酸素流量100ml/min、RF出力100Wで、1分間プラズマエッチングを行った後、上記溶液を実施例1と同様に図4に示すパターン状に、フィルム片面に塗布し、窒素置換され内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて4時間放置することにより重合反応を行った。その結果、オリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたアガロース微粒子を含むポリマー層が図4に示すパターン状に形成された核酸固定化フィルムを得た。

(7)

12

* 列番号2)

オリゴヌクレオチドの合成はPEバイオシステムズ社の自動合成機DNA/RNA synthesizer (model 394)を用いて行い、一般的手法により、脱保護及び精製して使用した。また、DNA合成の最終ステップで、ビオチンアミダイトを用いてビオチン化したプローブを調製した。

【0044】実施例1

生体高分子固定化フィルムの作製(1)：ナイロンフィルム（日本ボール株式会社製 バイオダインA）に対し、参考例1において作製した未修飾のオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）をそれぞれ、以下の方法により固定化した。参考例1において作製したオリゴヌクレオチド（プローブA）の水溶液（核酸濃度10μg/ml）およびオリゴヌクレオチド（プローブB）の水溶液（核酸濃度10μg/ml）を、スクリーン印刷を用いて図3に示すパターン状に、ナイロンフィルム片面に塗布し、続いて空气中で乾燥後、80℃で1時間ベーキングを行い、図3に示すオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）が線状の領域に固定化されたフィルムを得た。

【0045】実施例2

生体高分子固定化フィルムの作製(2)：ポリエチレンテレフタレートフィルム（フィルム厚み20μm）に対し、参考例1において作製したビオチン化オリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）をそれぞれ、以下の方法により固定化した。参考例1で得られた5'末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる溶液を作製した。

【0046】実施例3

生体高分子固定化フィルム積層体の作成(1) 実施例1で得た、オリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）がパターン状に固定化されたフィルム20枚の非固定化面に、ポリ酢酸ビニルの酢酸エチル溶液（固形分10%）を乾燥膜厚20μmになるよう塗布し、室温で乾燥した。次いで、上記フィルムの非固定化面と固定化面を順次接着することで、積層数20層の核酸固定化フィルムの積層体を得た。

【0047】実施例4

生体高分子固定化フィルム積層体の薄片の作成(1) 実施例3で得た核酸固定化フィルムの積層体を、フィルムに垂直方向にマイクロームを用いて100μmの厚さ

13

に切り出すことにより、図5に示す核酸固定化フィルム積層体断面を有する薄片を得た。

【0048】実施例5

生体高分子固定化フィルム積層体の作成 (2)

実施例2で得たオリゴヌクレオチド (プローブA、プローブB) がパターン状に固定化されたフィルムの非固定化面に、ポリ酢酸ビニルの酢酸エチル溶液 (固形分10%) を乾燥膜厚20 μ mになるよう塗布し、室温で乾燥した。ついで、上記フィルムの端面よりPE/酢酸ビニル共重合体ロッド (直径2mm) を芯にして接着しながら巻き取ることにより核酸固定化フィルムの積層体を得た。

【0049】実施例6

生体高分子固定化フィルム積層体の薄片の作成 (2)

実施例5で得た核酸固定化フィルムの積層体を、フィルムに垂直方向にマイクロームを用いて100 μ mの厚さに切り出すことにより、図6に示す核酸固定化フィルム積層体断面を有する薄片を得た。

【0050】参考例2

試料核酸の標識：試料核酸のモデルとして、参考例1で合成したオリゴヌクレオチド (プローブA、プローブB) の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド (C、D) を合成した。

オリゴヌクレオチドC：GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号3)

オリゴヌクレオチドD：CTGCTGTCCCAAAACCCTGACCTCCACC (配列番号4)

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、参考例4と同様にしてアミノリンクII (商標名) (PEバイオシステムズジャパン社) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₆を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン (DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) で標識した。末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100mMホウ酸緩衝液 (pH8.5) に終濃度2mMになるように溶かした。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarboxyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/mlジメチルホルムアミド溶液) を加え、室温にて一晩静置した。量を10.0 μ lに調整し、2 μ lのグリコーゲン (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)、10 μ lの3M酢酸ナトリウム (pH5.2)、300 μ lの冷エタノールを加え、15,000rpm 15分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に500 μ lの70%エタノールを加え15,000rpm 5分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100 μ lの10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mMEDTAに溶かした。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核

(8)

14

酸のモデルとして用いた。

【0051】参考例3

ハイブリダイゼーション：実施例3並びに実施例4で作製した核酸固定化フィルム積層体断面を有する薄片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、参考例2で得られたDIG標識DNAを加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション溶液組成：

5 \times SSC (0.75M塩化ナトリウム、0.075Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)

5%ブロッキング試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

0.1%N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02%SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

50%ホルムアミド

【0052】参考例4

検出：ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片を、あらかじめ保温しておいた50mlの0.1 \times SSC、0.1%SDS溶液に移し、振盪しながら20分間の洗浄を45℃で3回行った。下記組成のDIG緩衝液1を加え、室温で振盪しながらSDSの除去を行った。これを再度繰り返した後、下記組成のDIG緩衝液2を加え1時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG緩衝液2に1000分の1量の抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を加えた溶液10mlを加え、30分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に0.2% Tween 20を含むDIG緩衝液1で15分間2回振盪することにより洗浄し、引き続き下記組成のDIG緩衝液3に3分間浸した。DIG緩衝液3を除いた後、AMPPDを含むDIG緩衝液3mlを加え、10分間平衡化した。水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で1時間おいた後、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。その結果、何れも、プローブAが配置された場所には、オリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBが配置された場所には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

DIG緩衝液1：0.1Mマレイン酸、0.15M塩化ナトリウム (pH7.5)

DIG緩衝液2：DIG緩衝液1に0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの

DIG緩衝液3：0.1Mトリス-塩酸 (pH9.5)、0.1M塩化ナトリウム、0.05M塩化マグネシウム

ブロッキング試薬：抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体溶液及びAMPPDはDIG Detectionキット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) 中の試薬である。

(9)

【0053】

15

【発明の効果】本発明によれば、生体高分子が任意に高密度且つ正確に二次元に配列された薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の生体高分子の種類および量を調べることができる。本発明を従来法と比較した利点、有用性としては、例えば、固定化プロセスをフィルム上で分離・独立して行うことにより、鎖長によらず生体高分子の定量的固定が可能となったこと、固定化プロセスにパターンニング行程を導入したことにより、より容易に高密度に再現よく配列化可*10

16

*能となったこと、任意の厚みのフィルムを積層することにより測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能となったこと、また、その結果得られる選られる三次元構造体としての積層体から目的とする二次元配列体を作製するため、従来法にはない薄片化プロセスが新たに導入されたが、それに伴いスポッティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となり、連続切片化を通した多量生産が可能となったこと等があげられる。

【0054】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.
 <120> An Array of a Biopolymer-Fixed Film, a Slice of the Array and Process for Producing thereof
 <130> P110435000
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Synthetic DNA
 <400> 1
 gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg etc
 <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Synthetic DNA
 <400> 2
 gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Synthetic DNA
 <400> 3
 gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Synthetic DNA
 <400> 4
 ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

【0055】

【配列表のフリーテキスト】配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

【0056】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は積層体及び薄片を作製するための概要を示す図である。

【図2】図2は積層体及び薄片を作製するための概要を示す図である。

50 【図3】図3は生体高分子固定化フィルムを示す模式図

(10)

17

18

である。

【図4】図4は生体高分子固定化フィルムを示す模式図である。

【図5】図5は生体高分子固定化フィルム断面を示す模式図である。

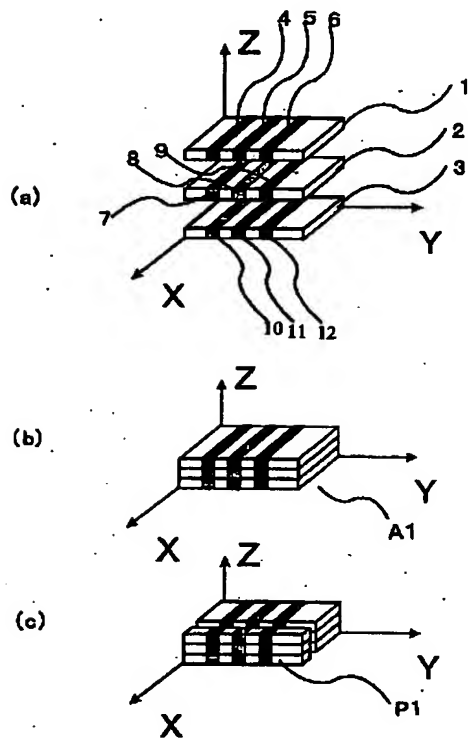
【図6】図6は生体高分子固定化フィルム断面を示す模式図である。

【0057】

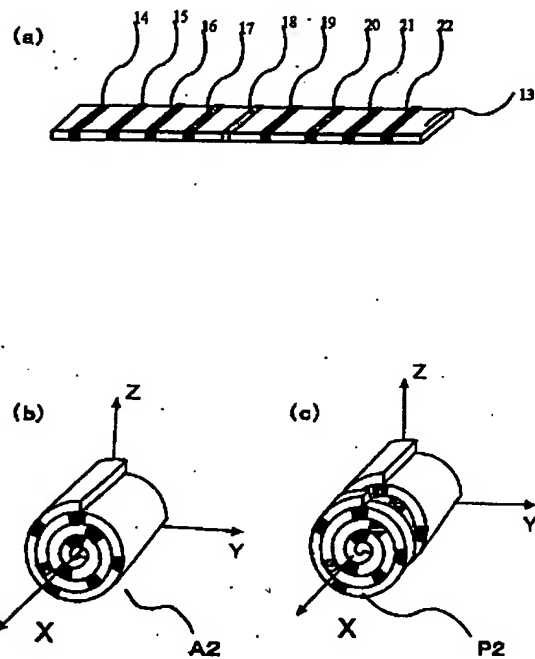
符号の説明：

- 1～3 … 生体高分子固定化フィルム
 4～12 … 生体高分子固定化領域
 13 … 生体高分子固定化フィルム
 14～22 … 生体高分子固定化領域
 23 … プローブAの固定化領域
 24 … プローブBの固定化領域

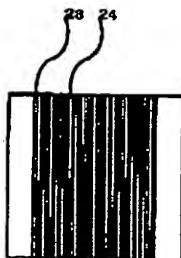
【図1】



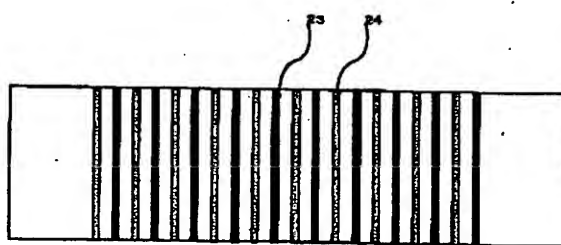
【図2】



【図3】



【図4】



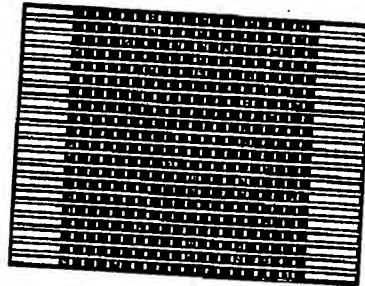
【図6】



BEST AVAILABLE COPY

(11)

【図5】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11
HA14
4B029 AA07 FA12 FA15
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR13
QR32 QR35 QR55 QR56 QR58
QR66 QS34 QX02 QX07
4F100 AA40A AA40B AK01A AK01B
AS00A AS00B BA02 BA24
DC22A DC22B GB90